

小腸阻血・再灌流と前初期遺伝子 *c-fos*, *c-jun* の 過剰発現に関する実験的研究

金沢大学医学部医学科外科学第二講座 (主任: 三輪晃一教授)

伊 藤 博

小腸の阻血・再灌流障害における絨毛細胞の脱落と再増殖の機序を解明するため、ルイスラットの上腸間膜動静脈の血管鉗子による20分間の遮断による阻血・再灌流後の、前初期遺伝子群の一種である核内転写因子 *c-fos* と *c-jun* の mRNA と蛋白の発現、増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) を用いた細胞増殖活性、 $[^{15}\text{N}]$ グリシンを用いた蛋白合成比速度とターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) 加ビオチン-デオキシウリジン-5'-三リン酸 (deoxyuridine-5'-triphosphate, dUTP) ニック末端標識 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling, TUNEL) 法を用いたアポトーシス細胞の出現を経時的に検討した。阻血・再灌流群の *c-fos* と *c-jun* の mRNA の発現は、再灌流後15分では対照群に比べそれぞれ6.3倍と4.4倍に増加した。また、阻血・再灌流群の細胞増殖活性は、再灌流後5分から4時間までは対照群に比べ有意に増加し、再灌流後30分では対照群に比べ4倍となった。阻血・再灌流群の蛋白合成比速度は、再灌流直後に上昇し、再灌流後2時間からは徐々に減少した。阻血直後と再灌流後60分を最高にアポトーシス発現の亢進が認められた。以上より、転写因子 *c-fos* と *c-jun* の過剰発現が、小腸の阻血・再灌流後のアポトーシスの発現とその後の蛋白合成促進に関与していることが明らかにされた。

Key words apoptosis, *c-fos*, *c-jun*, ischemia-reperfusion injury

阻血・再灌流障害は、血流の途絶により障害された組織が血流の再開によりさらに障害される現象で、臓器移植においては、移植臓器の機能的予後に大きな影響を与える因子である¹⁾²⁾。特に小腸では、阻血時間が長くなれば小腸粘膜は不可逆性の障害を免れることはできず、仮に阻血が短時間でも吸収能が障害される。阻血・再灌流による組織障害の機序として、再灌流後に血管内皮やマクロファージから産生される化学走化性因子により、好中球が再灌流を受けた組織へ集積して活性化され、血管内皮細胞へ接着し、さらに血管外へ遊走して、細胞障害をひきおこす過程が重要であると考えられている^{3)~5)}。好中球の集積ならびに血管内皮細胞への接着と血管外への遊走には、サイトカインまたは細胞間接着分子や血管細胞接着分子が関与していると考えられているが^{6)~8)}、これらの遺伝子の発現には転写因子の活性化が必要である。

核内転写因子である *c-fos* と *c-jun* は前初期遺伝子の一種で、DNA結合蛋白であるアクチベータープロテイン-1 (activator protein-1) を構成し、種々の遺伝子の発現を制御している。生体外では一般に増殖因子、熱ショック、放射線照射、紫外線照射、抗癌剤、リボポリサッカライドや蛋白合成阻害剤の投与で転写が活性化されることが解明されている^{9)~13)}。また、最近、肝臓、腎臓、心臓では、阻血・再灌流障害により *c-fos* と *c-jun*

の転写が活性化されることが報告され^{14)~16)}、増殖と分化またはアポトーシスの誘導との関係が検討されているが^{17)~20)}、その機序と役割に関する詳細は未だ十分には解明されていない。そこで、本研究では、小腸の阻血・再灌流障害における絨毛細胞の脱落と再増殖の機序を解明するため、ラット小腸の阻血・再灌流後の *c-fos* と *c-jun* 過剰発現の時間的推移と蛋白合成比速度ならびにアポトーシス細胞の発現を検討した。

材料および方法

I. 阻血・再灌流の実施と空腸の採取時間

体重250g前後のルイスラットを手術24時間前より絶食とした。40mg/kgのペントバルビタル (pentobarbital) の腹腔内投与による全身麻酔下に開腹した。トライツ (Treitz) 靱帯より回腸終末にいたるまでの全小腸を4等分し、口側から2等分目の1/4長の空腸を用いて阻血群と対照群を作成した。阻血群では、上腸間膜動脈と上腸間膜静脈を同時に血管鉗子を用いて20分間遮断することで阻血し、その後、遮断を解除して血流を再開通させることで再灌流とした。対照群では、血管鉗子による血流遮断は行わなかった。再灌流直後 (0分)、5分、10分、15分、30分、60分、2時間、4時間、8時間、12時間、24時間、48時間後に空腸を採取した。実験動物は各時間毎に5匹ずつ作

平成9年11月27日受付、平成9年12月26日受理

Abbreviations: DTT, dithiothreitol; G3PDH, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase; PBS, phosphate-buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; RNasin, ribonuclease inhibitor; RT, reverse transcription; TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling

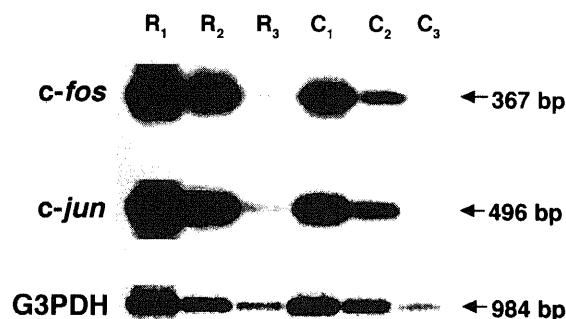
成した。

II. 逆転写 (reverse transcription, RT)-PCR サザンブロットハイブリダイゼーション

各実験動物の小腸粘膜から RNA を抽出した後、逆転写反応により作成した cDNA の段階希釈系列を作成し、PCR を施行した。アガロースゲル電気泳動後、各 PCR 産物を臭化エチジウム (ethidium bromide) 染色により解析した。また、それぞれの増幅 DNA 断片の塩基配列に特異的なプローベを用いたサザンブロットハイブリダイゼーション法により、増幅 DNA 断片の解析を行った。増幅 DNA 断片量は、それぞれの放射活性値を対照群の放射活性値で補正した相対的な値として表し、さらに *c-fos* および *c-jun* の mRNA 発現量は、それぞれの相対的 DNA 断片量を個々のラットグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, G3PDH) の相対的増幅 DNA 断片量で補正した値として表した。

1. 全 RNA の抽出

RNA の抽出にはイソゲン (ISOGEN) (ニッポンジーン, 富山) を用いた。空腸を採取後、直ちに粘膜を剪刀で細切し、1ml のイソゲン (4℃) を入れたホモジナイザー用ガラス容器に移し、ホモジナイザーで破碎、懸濁させた後、1分間室温に静置した。クロロホルム (chloroform) 0.2ml 添加後、攪拌、懸濁させ3分



Total RNA (μg) 1 10⁻¹ 10⁻² 1 10⁻¹ 10⁻²

Fig. 1. Southern blot analysis of *c-fos*, *c-jun* and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (G3PDH) mRNA RT-PCR products from serial dilutions of the cDNA reverse transcribed from the total RNA of the rat small intestinal mucosa. Total RNA (4 μg) from the mucosa was reverse transcribed in cDNA and the cDNA was diluted ranging from $\times 10^2$ to $\times 1$ and amplified by 25 cycles of PCR. Total RNA extraction from the ischemia/reperfusion group responder cell (R₁₋₃), and control group responder cell (C₁₋₃). bp, base pair.

Table 1. Estimation of *c-fos*, *c-jun* and G3PDH mRNA expression in intestinal mucosa 15 min following ischemia/reperfusion of rat small intestine

Gene	Relative amount ratio		Relative amount of mRNA
	PCR product	G3PDH	
<i>c-fos</i>	9.88	1.58	6.25
<i>c-jun</i>	6.06	1.39	4.36

間静置し、4℃、12000×gで15分間遠心した。上清を採取し、0.5mlのイソプロピルアルコール (isopropanol) を加え、-20℃で1時間静置後、4℃、12000×gで10分間遠心した。上清を除去した後、1mlの75%エタノール (ethanol) を加え、攪拌後、4℃、7500×gで5分間遠心し、再び上清を除去し10分間減圧乾燥した後、滅菌蒸留水に溶解した。各 RNA の 260nm における吸光度を測定し、1ODを40 μg/mlとして RNA 濃度を計算した。

2. プライマー (primer) およびプローブ (probe) 用オリゴヌクレオチド (oligonucleotide) の作成

367塩基対のラット *c-fos* 遺伝子 cDNA を特異的に増幅する PCR プライマーとしてセンスプライマー (687-706) 5'-GTAGAGCAGCTATCTCCTGA-3' とアンチセンスプライマー (1162-1180) 5'-TCCACATCTGGCAGAGC-3', および、プローブとして 5'-GGGGGTCTGCCTGAGGCTACCACCCC-3' (975-1000) をラット *c-fos* 遺伝子 cDNA の塩基配列より決定した。496塩基対のラット *c-jun* 遺伝子 cDNA を特異的に増幅する PCR プライマーとしてセンスプライマー (542-561) 5'-

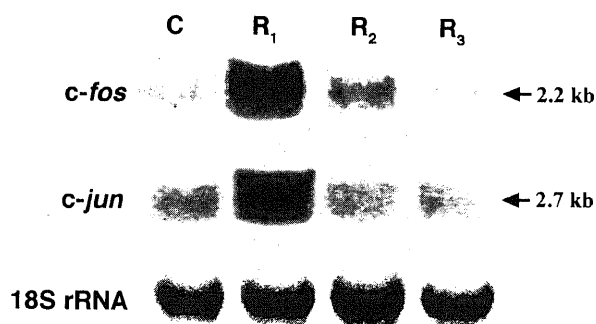


Fig. 2. Northern blot analysis of *c-fos*, *c-jun* mRNA and 18S rRNA in the rat small intestinal mucosa. The membranes were rehybridized with a ³²P-labeled oligonucleotide probe specific for the 18S rRNA to correct for variation in the loading and transfer of RNA. Lane C, control; lane R₁, postreperfusion 15 min; lane R₂, postreperfusion 60 min; lane R₃, postreperfusion 24 hr; kb, kilobase.

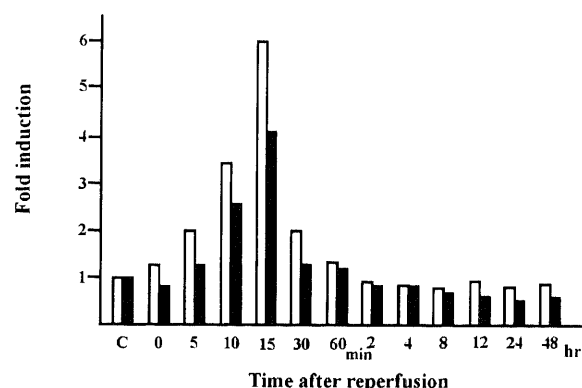


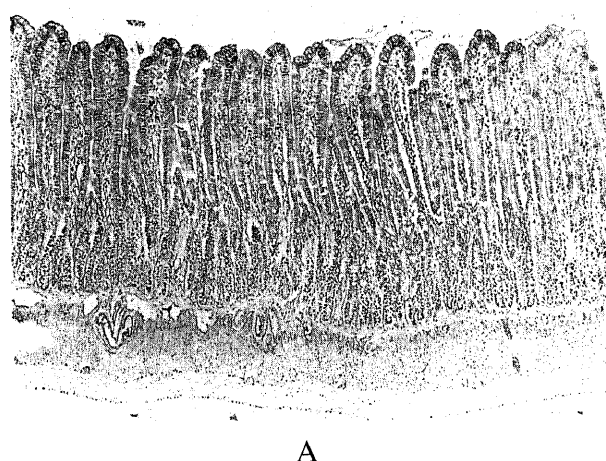
Fig. 3. Northern blot analysis of *c-fos* and *c-jun* expression in the rat small intestinal mucosa. Data are means of five separate experiments normalized with respect to 18S rRNA and express as the ratio of original values of *c-fos* or *c-jun* to control. White columns, *c-fos*; black columns, *c-jun*; C, control.

AACGACCTTCTACGACGATG-3' とアンチセンスプライマー (887-906) 5'-GCAGCGTATTCTGGCTATGC-3' および、プローブとして 5'-GCCGCACCTCCGAGCCGAACCTCGG-3' (674-699) をラット *c-jun* 遺伝子 cDNA の塩基配列より決定した。また 984 塩基対の G3PDH 遺伝子 cDNA を特異的に増幅する PCR プライマーとしてセンスプライマー (35-57) 5'-TGAAGGTCGGTGTCAACGGATT-3' とアンチセンスプライマー (995-1016) 5'-ATGTAGGCCATGAGGTCCACCA-3' および、プローブとして 5'-ATCCATGACAACCTTTGGCATCGTGG-3' (514-538) をラット G3PDH 遺伝子 cDNA の塩基配列より決定した。プローブ DNA 10pmol に対し [γ - 32 P] ATP (Amersham, Greenwich, USA) 10 μ Ci, ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH7.6), 10mM 塩化マグネシウム (MgCl₂), 5mM ジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT), 10mM スペルミジン (spermidine-HCl), 1mM EDTA], 10 単位 T4 キナーゼ (和光, 大阪) および滅菌蒸留水を加え全量を 6 μ l とし, 37℃で

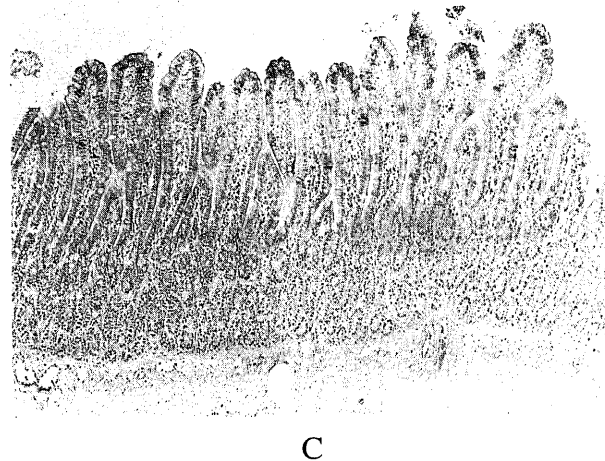
45 分間インキュベーションすることで 5' 末端を標識した後, ハイブリダイゼーションに用いた。

3. 逆転写 (RT) 反応

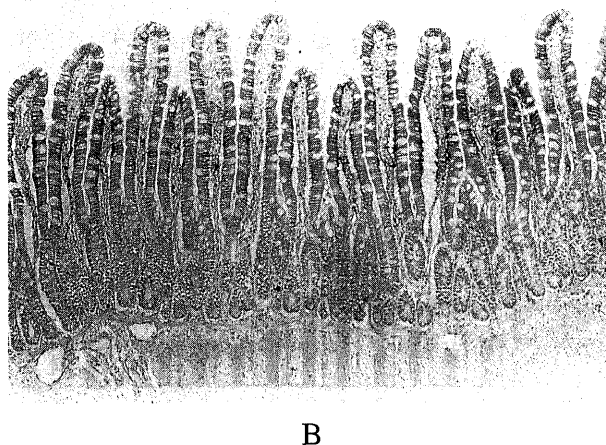
各 RNA サンプル 4 μ g にオリゴ (dT) プライマー [oligo (dT) 16 primer] (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CA) 1 μ g を加え蒸留水で全量を 33 μ l とし, 68℃で 15 分間加熱後, 氷中にて急冷した。これに RT 反応緩衝液 [50mM Tris-HCl (pH 8.3), 75mM 塩化カリウム (KCl), 3mM MgCl₂, 10mM DTT], デオキシリボヌクレオチド混合液 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 各 0.5mM), RNA 分解酵素阻害因子 (ribonuclease inhibitor, RNasin) (Promega Biotec, Madison, USA) 2 単位, 逆転写酵素 (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, M-MLV RT) (Gibco, Rockville, USA) 200 単位および滅菌蒸留水を加え全量 50 μ l とし, 42℃で 1 時間インキュベーションして cDNA を合成した。さらに 95℃にて 5 分間加熱した後, 氷中にて急冷した。各々の cDNA 溶液 50 μ l は RNA 4 μ g から合成されたもので



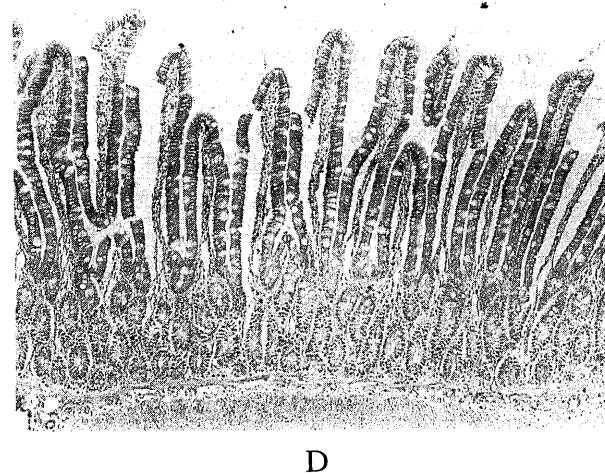
A



C



B



D

Fig. 4. Light microscopic immunostaining for c-Fos and c-Jun proteins in the rat small intestine. (A) In the control group, c-Fos immunoreactivity is observed at the tips of the villi in the cellular nuclei ($\times 200$). (B) In the ischemia/reperfusion group, a marked c-Fos immunoreactivity is observed in the cellular nuclei of the absorptive epithelial cells and in the cytoplasm diffusely ($\times 200$). (C) c-Jun immunoreactivity is observed at the tips of the villi in the cellular nuclei in the control group ($\times 200$). (D) In the ischemia/reperfusion group, positive immunostaining of the c-Jun is seen in the nuclei of the absorptive epithelial cells and in the cytoplasm diffusely ($\times 200$).

あるため、RNA $1\mu\text{g}$ から合成された cDNA 量に相当する溶液量は $12.5\mu\text{l}$ となる。また RNA $10^{-1}\mu\text{g}$, $10^{-2}\mu\text{g}$ に相当する cDNA 溶液量はそれぞれ 12.5×10^{-1} , $12.5 \times 10^{-2}\mu\text{l}$ に相当する。このため cDNA 溶液の 3 段階 10 倍希釈系列 (原液, 10 倍希釈液, 10^2 倍希釈液) を作成し、それぞれ $12.5\mu\text{l}$ ずつを PCR 反応に使用して、目的とする mRNA の定量化を行った。また *c-fos* mRNA および *c-jun* mRNA 発現量の定量化に際し、G3PDH は内部コントロールとして使用した。

4. PCR 反応

各々の cDNA 溶液 $12.5\mu\text{l}$ に PCR 反応緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl_2 , 0.01%ゼラチン (Sigma, St. Louis, USA), デオキシリボヌクレオチド混合液 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 各 $250\mu\text{M}$)], センスおよびアンチセンスプライマー各 50pmol, Taq DNA ポリメラーゼ (Perkin Elmer) 1 単位および滅菌蒸留水を加え全量 $30\mu\text{l}$ に調整した。これに $20\mu\text{l}$ のミネラルオイル (Sigma) を重層させ、サーマルサイクラー (PC700) (アステック, 福岡) で PCR 反応を行った。熱変性を 94°C , 1 分間, アニーリングを 58°C , 2 分間, DNA の伸長を 72°C , 2 分間とし、これを 1 サイクルとして 25 サイクル施行した。

5. 増幅 DNA 断片の検出

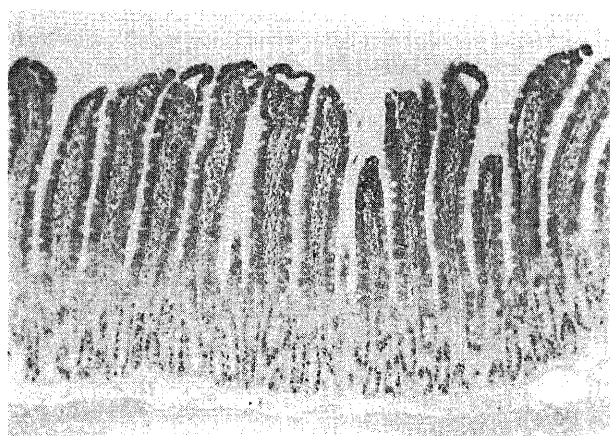
PCR 反応後の DNA 溶液に滅菌蒸留水 $70\mu\text{l}$ とクロロホルム $150\mu\text{l}$ を加えて振盪した後、上層の PCR 反応溶液を採取した。この溶液に $10\mu\text{l}$ の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と 99% エタノールを $300\mu\text{l}$ 添加し、 -80°C で 30 分間放置した後、 4°C , $15000 \times g$ で 20 分間遠心し、DNA を沈殿させた。この DNA を 80% エタノールで洗浄後、減圧乾燥し、試料溶解液 [0.06% ブロモフェノールブルー (bromophenol blue), 0.06% キシレンシアノール (xylene cyanol) 6.7% グリセロール (glycerol) を含む Tris-EDTA 緩衝液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)] $9\mu\text{l}$ に溶解した。各試料は $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ の臭化エチジウムを含む泳動緩衝液 (40mM Tris, 20mM 酢酸ナトリウム, 1mM EDTA, pH 8.0) 中で、定電圧 100V にて、1.5% アガロースゲル (agarose gel) を用いて電気泳動を行った。泳動後のゲルは紫外線照射下

に写真撮影を行った後、サザン法に準じて DNA の転写を行った。すなわち、泳動終了後のゲルをアルカリ変成液 [0.5M 水酸化ナトリウム (NaOH), 1.5M 塩化ナトリウム (NaCl)] 中で 30 分間振盪し DNA を変成させた後、中和液 (3M NaCl, 0.5M Tris-HCl, pH 7.2) 中で 15 分間の振盪を 2 回繰り返した。DNA は $20 \times \text{SSC}$ を用いてゲルからナイロンメンブレンフィルター (Hybond-N+ nylon membrane, Amersham) に転写した。転写後のフィルターに 10 分間紫外線を照射して DNA のフィルターへの固定を強固なものとした。フィルターをラピッドハイブリダイゼーションバッファー (Rapid hybridization buffer, Amersham) を満たしたハイブリバック (コスモバイオ, 東京) 内に入れ、 42°C の恒温水槽内で 15 分間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、 ^{32}P で標識したプローベを最終濃度が $1\text{pmol}/\text{ml}$ となるようにハイブリバック内へ投与し、 42°C の恒温水槽内で 2 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後のフィルターを 42°C の $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS 溶液で 15 分間 2 回洗浄した後、バイオイメージアナライザー (富士フィルム, 東京) を用いて、PCR 増幅 DNA 断片に相補的に結合したプローベの放射活性を測定し、DNA 断片を定量化した。

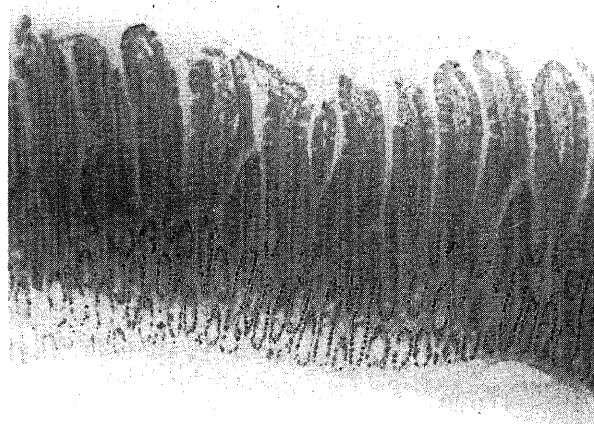
Ⅲ. ノーザンプロットハイブリダイゼーション

RT-PCR サザンプロット法に用いた同じ小腸片から RNA を抽出し、*c-fos* および *c-jun* cDNA をプローブとしたノーザンプロットハイブリダイゼーションを行った。同じフィルターをデハイブリダイゼーションを行った後、18S rRNA cDNA と再びハイブリダイゼーションを行い、得られたシグナルを内部コントロールとした。それぞれの放射活性値を内部コントロールの 18S rRNA の放射活性値で補正し、さらに対照群の値を 1 として表した。これに基づいて小腸片の *c-fos* と *c-jun* の mRNA の発現を経時的に検討した。

すなわち、抽出した RNA 各 $20\mu\text{g}$ をホルムアミド (formamide) とホルムアルデヒド (formaldehyde) で変成後、2% ホルムアルデヒド加 1.5% アガロースゲル上を電気泳動し、ナイロンメンブレンフィルターに転写した。メンブレンフィル



A



B

Fig. 5. Immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein in the rat small intestine. (A) Labeled cells are observed in the lower third of crypt cells in the control group ($\times 200$). (B) PCNA strong immunoreactivities are seen in the nuclei of the lower third of crypt cells in the ischemia/reperfusion group ($\times 200$).

ターを風乾後、80℃で2時間ベーキングした。プローブはサザンブロット法と同じ³²P標識cDNAを使用し、ハイブリダイゼーション液 [50%ホルムアミド, 5×デンハルト (0.1%ポリビニールピロリドン, 0.1%ウシアルブミン, 0.1%フィコール), 1M NaCl, 10%硫酸デキストラン (Dextran Sulfate), 1% SDS, 50mM Tris (pH 7.5), 100μg/ml変性サケ精子DNA] 中で20~24時間、42℃にてハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションした後、メンブレンフィルターを洗浄し、-80℃でオートラジオグラフィーを行った。

IV. 免疫組織化学染色

c-fos および *c-jun* 遺伝子産物がそれぞれ小腸に実際に発現していることを、抗c-Fosモノクローナル抗体および抗c-Junモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色で確認した。また、小腸粘膜の細胞動態を解析するため、細胞周期のG₁後期からS期前半に存在する細胞増殖期関連核蛋白である増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) の標識率を検討した。

すなわち、採取した空腸の一部を、10%ホルマリン液で固定し、免疫組織化学染色に供した。パラフィン包埋10%ホルマリン固定標本より4μm切片を3個作製し、脱パラフィン後内因性ペルオキシダーゼを不活化するため0.3%過酸化水素水加メタノールに20分間浸透し、リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) (phosphate-buffered saline, PBS) で洗浄した。次に非特異的抗原抗体反応を防止するため正常ヤギ血清 (Dakopatts, Copenhagen, Denmark) に15分間反応させた後、100倍希釈抗c-Fosモノクローナル抗体 (Oncogene Research Products, Cambridge, USA), 100倍希釈抗c-Junモノクローナル抗体 (Oncogene Research Products), 50倍希釈抗PCNAモノクローナル抗体 (Oncogene Research Products) と一晩4℃にて反応させた。PBSにて洗浄した後、ビオチン化抗マウスIgG抗体 (Dakopatts) に室温で30分間反応させ、次いでストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (Dakopatts) に15分間反応させ、0.04% 3, 3'-ジアミノベンチジン (3,3'-diaminobenzidine) (Sigma) 溶液で発色させた。核染色は0.3%メチルグリーンにて行った。陰性コントロールには1次抗体として非免疫マウス血清を用い、陽性像が得られないことを確認した。PCNA標識率は1腺管における細胞核のPCNA染色陽性細胞の割合で表し、1検体につき10腺管以上観察しその平均値で表した。

V. 組織蛋白合成比速度

阻血・再灌流を負荷するルイスラットを手術24時間前より絶食とし、全身麻酔下に、まず、Steigerら²⁰⁾により開発された

方法に準じて、右頸静脈より外径1.1mm, 内径0.6mmのシリコンカテーテル (ダウコーニング, 横浜) を上大静脈に挿入し固定した。その後開腹し、小腸の阻血・再灌流後直ちに、カテーテルの末梢側は皮下を通過させ、さらに背部に固定した皮膚固定器およびそれに接続した保護コイル内を通し、回転鑢に接続した。回転鑢は代謝ゲージ外側上方に固定し、カテーテル接続用チャンバーセット (ニプロ, 大阪) で輸液持続注入ポンプに接続した。実験動物は各時間毎に5匹ずつ作成し、カテーテルを装着したラットは、1匹ずつ代謝ゲージ内に収容した。完全絶飲食で準無拘束とし、^[15N] グリシン [窒素原子の標識濃度98.2%, グリシンとしての純度99.5%のもの (昭光通商, 東京)] を生理食塩水にて最終濃度が4mg/mlになるように溶解し、8mg/時間で持続投与し、阻血・再灌流後2時間, 6時間, 24時間後に空腸粘膜と肝臓を採取した。

各組織約1gを用いて、10%トリクロール酢酸10mlを加え、氷冷下にてPotter-Elvehjem型オール・ガラス・ホモジナイザーを用いて、破碎、懸濁した。懸濁後3000rpmで10分間遠心分離し上清を採取した。次いで、沈渣を2%トリクロール酢酸で3回洗浄した後得られた上清を、先に採取した上清に加え、組織中の遊離低分子窒素化合物の抽出液とした。抽出液および沈渣中の総窒素を、semimicro-Kjeldahl法により定量し、さらに

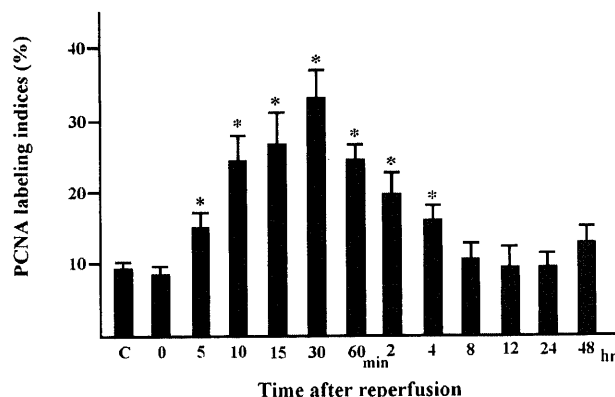


Fig. 6. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) labeling indices following ischemia/reperfusion. PCNA labeling indices are obtained as the percentage of PCNA positive nuclei relative to the total number of crypt cells, and calculate from observation of at least 10 crypts in each experiment. Every measurement is repeated at least once and is performed in five rats in each time point. Values are expressed as $\bar{x} \pm SD$. * $p < 0.05$ by Student's *t* test.

Table 2. Sequential fractional protein synthesis rate in the rat small intestinal mucosa

Group	Time (hr)	Sb	Si	Ks
Control	2	0.034 ± 0.008	0.403 ± 0.040	106.8 ± 25.3
	6	0.122 ± 0.006	0.755 ± 0.047	70.7 ± 7.6*
	24	0.522 ± 0.073	1.435 ± 0.069	45.2 ± 6.3*
Ischemia/ reperfusion	2	0.023 ± 0.007	0.237 ± 0.059	126.0 ± 26.1
	6	0.101 ± 0.017	0.452 ± 0.073	102.2 ± 14.8*
	24	0.488 ± 0.101	1.122 ± 0.248	61.7 ± 20.8**

Assay was performed in five rats in each group. The values are expressed as $\bar{x} \pm SD$. Sb, ¹⁵N enrichment of tissue protein; Si, ¹⁵N enrichment of intracellular free amino acids; Ks, fractional protein synthesis rate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.1$ by Student's *t* test.

質量分析計 (ANCA-MS, European Scientific, Cheshire, UK) を用いて ^{15}N のアトムパーセント (atom percent) を測定した。窒素量および ^{15}N の過剰アトムパーセントより、次に示す Garlick ら²⁰⁾の公式を用いて、蛋白合成比速度を各組織ごとに算出した。なお、 ^{15}N は天然存在比が 0.365% であり、測定値と天然存在比との差を過剰アトムパーセントとした。

$$\text{Sb}/\text{Si} = \text{R}/\text{R} - 1 \cdot 1 - e^{-\text{Ks}t} / 1 - e^{-\text{Rk}t} - 1/\text{R} - 1$$

ただし、Sb は蛋白結合窒素中の ^{15}N の濃度、Si は遊離アミノ酸結合窒素中の ^{15}N 濃度、R は蛋白結合窒素と遊離アミノ酸結合窒素の比、t は ^{15}N グリシンの注入時間 (日)、Ks は蛋白合成比速度 (%/日) を表す。また、R は Stein ら²⁰⁾に従い 80 を用いた。

VI. 組織切片を用いたアポトーシスの検出

免疫組織化学染色に用いたホルマリン固定パラフィン包埋標本より、4 μm 薄切片を作製し、ターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) 加ビオチン-デオキシウリジン-5'-三リン酸 (deoxyuridine-5'-triphosphate, dUTP) ニック末端標識 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling, TUNEL) 法²¹⁾にてアポトーシス細胞の検出を行った。薄切標本を脱パラフィンし親水後、2% 過酸化水素水加メタノール液に室温で 20 分間反応させ内因性ペルオキシダーゼをブ

ロックした。流水にて水洗し、PBS に室温で 3 分間浸した。20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ プロテナーゼ K (Proteinase K) (Sigma) にて除蛋白後、流水にて水洗し、TdT 緩衝液 (100mM カコジル酸カリウム, 2mM 塩化コバルト (CoCl_2), 0.2mM DTT, pH 7.2) に 3 分間浸した。次いで、TdT 緩衝液に 0.3U/ μl TdT (Oncor, Gaithersburg, USA) と 0.04nmol/ μl ビオチン標識 dUTP (Oncor) を加えた TdT 反応液を適量滴下し、各組織片にカバーガラスをかけ 37°C の加湿器で 60 分間反応させた。次に緩衝液 (0.3M NaCl, 30mM クエン酸ナトリウム) に 30 分間浸して TdT 反応を停止した。PBS で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシン抗体 (Oncor) と 30 分間反応させた。PBS で洗浄の後、過酸化水素水を添加した 3, 3'-ジアミノベンチジンで発色し、メチルグリーンで核染色を行った。TdT 処理前にカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に溶解した 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dnase 1 (Sigma) 溶液で 10 分間処理した組織切片を陽性コントロールとして、TdT を含まずに TdT 緩衝液のみで処理した組織切片を陰性コントロールとして用いた。1 腺管における細胞核の TUNEL 染色陽性細胞の経時的な割合をアポトーシス指数として、1 検体につき 10 腺管以上を観察し、その百分率の平均値で表した。

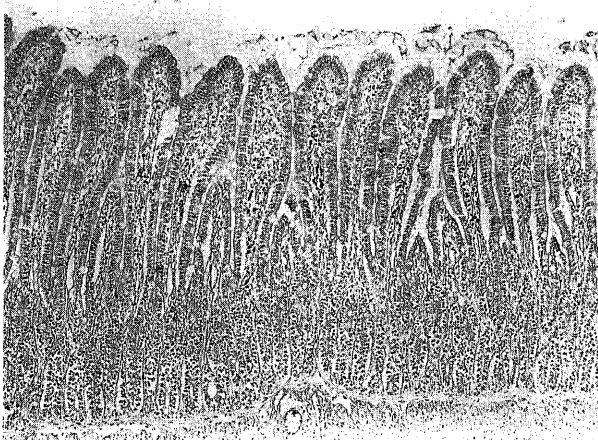
VII. DNA 断片化の解析

採取した粘膜の一部を切り出し、直ちに剪刀で細かく切り刻

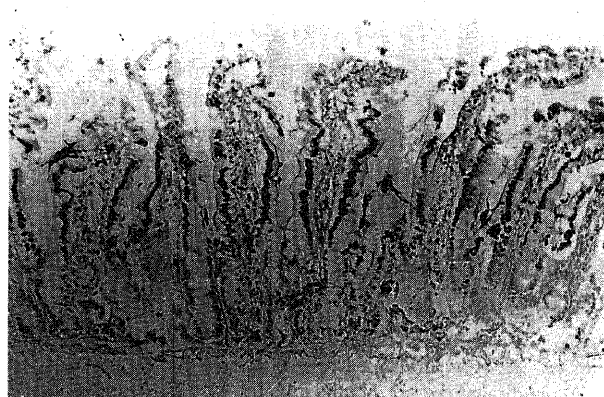
Table 3. Sequential fractional protein synthesis rate in the rat liver

Group	Time (hr)	Sb	Si	Ks
Control	2	0.036 \pm 0.003	1.450 \pm 0.102	30.1 \pm 3.1
	6	0.111 \pm 0.003	2.050 \pm 0.134	22.2 \pm 1.1
	24	0.386 \pm 0.014	2.661 \pm 0.237	15.8 \pm 1.5
Ischemia/ reperfusion	2	0.035 \pm 0.005	1.392 \pm 0.156	30.9 \pm 6.0
	6	0.097 \pm 0.007	1.519 \pm 0.062	26.5 \pm 1.3
	24	0.364 \pm 0.041	2.295 \pm 0.367	18.3 \pm 3.5

Assay was performed in five rats in each group. The values are expressed as $\bar{x} \pm \text{SD}$.



A



B

Fig. 7. Detection of apoptosis following ischemia/reperfusion in the rat small intestine. Apoptotic cells are stained by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) method. (A) In the control group, TUNEL signals are only observed in the nuclei of tip of the villi ($\times 200$). (B) In the ischemia/reperfusion group, TUNEL signals are detected in the nuclei of absorptive epithelial cells except the lower third of villi ($\times 200$).

み, $1\mu\text{l}$ を $20\mu\text{l}$ の溶解液 [50mM Tris-HCl (pH 7.8), 10mM EDTA, 0.5% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム (sodium-N-lauroylsarcosinate) (和光, 大阪), 0.5mg/ml プロテナーゼK] に加え攪拌した。これを, 50°C で90分間インキュベーションした後, RNasinを $1\mu\text{l}$ 加え攪拌し, さらに 50°C で30分間インキュベーションした。このサンプルを1.8%アガロースゲルにて電気泳動し, 断片化したDNAを臭化エチジウムで染色し, ヌクレオソームレベルでの切断を示すDNAラダーの有無を検討した。

VII. 統計学的検討

各数値は平均値 \pm 標準偏差 ($\bar{x} \pm \text{SD}$) をもって表し, 平均値の差の有意差検定はF検定により等分散の検定を行った後, Studentのt検定を行い, 危険率5%未満を有意とした。

成 績

I. RT-PCR サザンブロット法による *c-fos* と *c-jun* の mRNA の発現

c-fos に対するプライマーペアーでは *c-fos* 由来の367塩基対の増幅DNA断片が特異的に検出され, *c-jun* に対するプライマーペアーでは *c-jun* 由来の496塩基対の増幅DNA断片が特異的に検出され, またG3PDHに対するプライマーペアーではG3PDH由来の984塩基対の増幅DNA断片が特異的に検出された。サザンブロットハイブリダイゼーション法では各々が単一のバンドとして検出された (図1)。検出されたDNA断片は, 相補結合したプローベの放射活性を測定することで定量化した。両対数グラフの横軸に鋳型RNA量をプロットし, 縦軸に測定した放射活性量をプロットすると, 両者はほぼ直線関係になるとともに, この直線の傾きはPCRのターゲットが同一の場合, 各実験群間での違いは認められずほぼ一定であり, 本法の高い定量性が示された。また遺伝子発現の内部コントロールとしたG3PDHの発現量には各実験群間で殆ど差は認められなかった (結果未表示)。これに基づいて検出されたDNA断片から *c-fos* と *c-jun* の相対的mRNA発現量を比較すると, 阻血・再灌流後

15分が最大で, 阻血群では対照群に比べてそれぞれ6.3倍, 4.4倍の過剰発現が認められた (表1)。

II. ノーザンブロット法による *c-fos* と *c-jun* の mRNA の発現

c-fos および *c-jun* はそれぞれ2.2kb, 2.7kbに単一のバンドが認められ, この発現は阻血・再灌流後15分を最大とする一過性の発現であった (図2)。*c-fos* と *c-jun* のmRNAの経時的な発現を検討すると, 阻血・再灌流後15分が最大で, 対照群に比べそれぞれ6倍, 4倍の過剰発現が認められた (図3)。この結果はRT-PCRサザンブロット法による *c-fos* と *c-jun* のmRNAの発現の結果と一致した。

III. 免疫組織化学染色

対照群のc-Fosおよびc-Jun蛋白は, いずれも絨毛の先端の細胞だけ, 核が染色されたのに対し, 阻血・再灌流群では, 吸収上皮細胞の核と細胞質がびまん性に染色され, 特に増殖帯以外の細胞核が染色された (図4A-D)。

IV. 細胞動態の解析

PCNA免疫染色では, 対照群では増殖帯の細胞核に散在性に染色陽性所見が認められたのに対し, 阻血・再灌流群では, 対照群に比べて染色陽性細胞数の明らかな増加を認めた (図5A, B)。阻血・再灌流群のPCNA標識率は阻血・再灌流後5分から4時間までは対照群に比較して有意な高値を示し, 阻血・再灌流30分では対照群に比較して4倍であった (図6)。

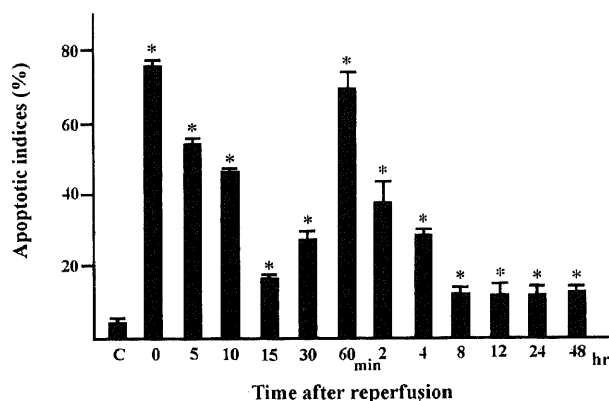


Fig. 8. Apoptotic indices following ischemia/reperfusion. Apoptotic indices are obtained as the percentage of terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) positive cells relative to the total number of crypt cells, and calculate from observation of at least 10 crypts in each sample. Every measurement is repeated at least once and is performed in five rats in each time point. Values are expressed as $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $p < 0.05$ by Student's *t* test.

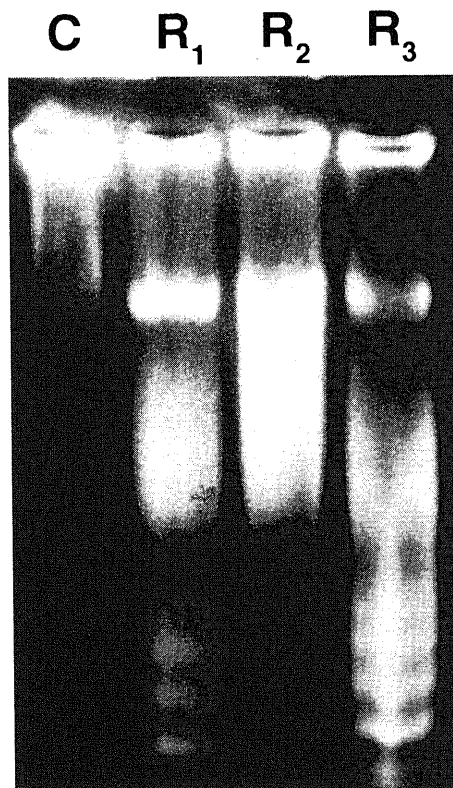


Fig. 9. DNA laddering following ischemia/reperfusion on a 1.8% agarose gel electrophoresis. DNA laddering is seen on an agarose gel electrophoresis in the ischemia/reperfusion group, but is absent in the control group. Lane C, control; lane R_1 , postreperfusion 0 min; lane R_2 , postreperfusion 30 min; lane R_3 , postreperfusion 60 min.

V. 蛋白合成比速度の検討

1. 小腸粘膜における蛋白合成比速度

阻血・再灌流群の小腸粘膜の蛋白合成比速度は、再灌流後2時間を最高に徐々に減少したが、いずれの時間においても対照群に比べて高く、再灌流後6時間の値は、 102.2 ± 14.8 と対照群の 70.7 ± 7.6 より有意に高かった(表2)。

2. 肝臓における蛋白合成比速度

両群間の肝臓における蛋白合成比速度には有意差を認めなかった(表3)。

VI. 組織切片を用いたアポトーシスの検出

対照群では絨毛の先端の細胞のみ核がTUNEL法で染色されたが、阻血・再灌流群では増殖帯を除く吸収上皮細胞の核が染色された(図7A, B)。1腺管における細胞核のTUNEL染色陽性細胞の割合は、阻血直後と阻血・再灌流後60分に最大となった(図8)。

VII. DNA断片化の解析

阻血・再灌流群ではDNAラダーが認められたが、対照群では認められなかった(図9)。

考 察

移植に用いられる移植片は温阻血に引き続く冷保存と移植後の再灌流により障害を受ける。その障害が可逆性か不可逆性かは、移植片の細胞の死と増殖の相対的割合によるものと考えられている。一方、前初期遺伝子群の *c-fos* と *c-jun* は、阻血・再灌流障害時に活性化され²⁸⁾、再生²⁹⁾³⁰⁾またはアポトーシス¹⁷⁾¹⁹⁾³¹⁾に関与しているとされているが、その詳細については未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、阻血・再灌流障害における *c-fos* と *c-jun* の過剰発現の時間的推移を検討した。

本研究では、*c-fos* と *c-jun* の mRNA の発現は阻血・再灌流後15分をピークとする一過性の発現で、対照群と比較してそれぞれ6.3倍と4.4倍に増加していた。*c-fos* と *c-jun* の mRNA 発現量の比較検討を比較的操作が簡便な RT-PCR 法を用いて行ったが、RT-PCR法の段階希釈系列を用いた結果がノーザンブロット法による定量化の結果と一致したことにより、臨床応用に際しては、RT-PCR法を用いて少量の生検材料から諸臓器の *c-fos* と *c-jun* 遺伝子の発現を検討することも可能であると考えられる。また、これら mRNA が小腸粘膜のどの部位で発現しているかを確認するために、抗 *c-Fos* と抗 *c-Jun* モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。対照群では絨毛の先端の核のみしか染色されなかったが、阻血・再灌流群では吸収上皮細胞の核と細胞質、特に増殖帯以外の細胞核が強く染色された。この結果は、小腸の阻血・再灌流障害により吸収上皮細胞が変化を受けることを示している。

次に、*c-fos* と *c-jun* の活性化の影響を小腸粘膜の細胞動態の面から検討した。PCNAはDNAポリメラーゼ δ の補助蛋白として、DNA複製時に細胞周期のG₁期後期とS期早期の細胞核内に発現する³²⁾³³⁾。ホルマリン固定標本を用いての免疫染色が可能であり、その標識率は細胞増殖活性を表す一つの指標とされている³⁴⁾³⁵⁾。阻血・再灌流群では増殖帯を中心にPCNAの発現が増加したが、これは阻血・再灌流を契機に増殖帯で細胞分裂が誘発され、DNAの複製が開始されることを意味している。また、細胞増殖活性のピークは、*c-fos* と *c-jun* の mRNA が過剰発現する時間帯より遅れて、阻血・再灌流後30分に認められた。さらに、*c-Fos* と *c-Jun* 蛋白の免疫組織染色による発現部位

とPCNAの発現の局在が一致しなかった。したがって、*c-fos* と *c-jun* の mRNA の過剰発現と粘膜の再生とは直接には関係していないものと推測される。

c-fos と *c-jun* の発現は移植時のグラフトの機能不全や臓器障害の重症度と密接な関係があるとされ¹⁴⁾¹⁷⁾、さらに *c-fos* と *c-jun* の過剰発現はアポトーシスを誘導するとの報告もみられる¹⁸⁾¹⁹⁾²³⁾。本研究では、阻血・再灌流後の小腸におけるアポトーシス細胞の検出を、TUNEL法を用いて免疫組織学的に、また、アガロースゲル電気泳動法を用いて生化学的にDNAの断片化を解析することで行った。TUNEL法の原理は、DNAの3'-OH末端をビオチン-dUTPとTdTを用いて標識することである。アポトーシス細胞がごくわずかしかな存在しない場合でも検出可能であり、また組織中のアポトーシス細胞の局在や割合までもが解析可能であるとされている³⁶⁾³⁷⁾。また、アガロースゲルの電気泳動法は、DNAのヌクレオソーム単位での断片化を検出するものであり^{38)~40)}、生化学的にも阻血・再灌流群だけにDNAラダーが認められたことから、TUNEL法は阻血・再灌流障害によるアポトーシス細胞の出現を明確に検出していると考えられる。さらに、アポトーシス細胞出現の局在部位も重要である。本研究の対照群ではアポトーシス細胞は絨毛の先端にのみ認められたのに対し、阻血・再灌流群では増殖帯を除く吸収上皮細胞全域に認められた。アポトーシス細胞の局在は免疫組織学的にみた *c-Fos* と *c-Jun* 蛋白の発現の局在と一致しており、*c-Fos* と *c-Jun* の発現とアポトーシス誘導との関係を推測することが可能である。一方、アポトーシス指数は、阻血直後と再灌流後60分をピークとしていた。阻血・再灌流直後のアポトーシス細胞の発現は、阻血による微小循環障害によるものと推察され、再灌流後60分のピークは主に再灌流後に産生される化学走化性因子による細胞障害の結果であると考えられた。この発現は *c-fos* と *c-jun* の mRNA の一過性の過剰発現の後に惹起されており、しかも *c-Fos* と *c-Jun* 蛋白の発現部位はアポトーシス細胞の発現部位と一致した。これらの結果は、*c-fos* および *c-jun* の発現とアポトーシス誘導との関係をさらに強く示唆するものである。

一方、阻血・再灌流がアポトーシスに引き続く細胞増殖、すなわち、蛋白合成を誘導するか否かは重要な問題であるが、阻血・再灌流後の組織蛋白代謝を検討した報告はみられない。同位元素を利用した蛋白合成比速度の測定には直接法と間接法がある。Garlickら²⁹⁾の方法は組織中に取り込まれたアイソトープの量を測定する直接法である。Picouら⁴¹⁾の方法は、代謝終末産物である尿中窒素、尿中アンモニアあるいは呼気中へのアイソトープの排出量を測定する間接法⁴²⁾である。本研究では、Garlickらの方法を用いて組織蛋白合成比速度を測定した。阻血・再灌流群の小腸粘膜の蛋白合成比速度はいずれの時間においても対照群に比べて高く、再灌流後2時間を最高に徐々に減少し、再灌流後6時間の値は統計学的に有意であった。したがって、小腸の阻血・再灌流後の蛋白合成の活性化にも *c-fos* および *c-jun* の活性化が関与していると考えられる。

以上、本研究では、小腸の阻血・再灌流後に、転写因子である *c-fos* と *c-jun* が mRNA および蛋白レベルで過剰発現し、次いでアポトーシス、さらに蛋白合成が促進されることを明らかにした。小腸移植片の粘膜の *c-fos* と *c-jun* の mRNA の発現を検出することで、移植片の不可逆性変化を組織学的または臨床病理学的変化より早く察知し、前もって移植後の生着と生育能力を

知ることが可能となることから、臓器移植への臨床応用が期待される。

結 論

小腸の阻血・再灌流障害における絨毛細胞の脱落と再増殖の機序を解明するため、ラット小腸粘膜の阻血・再灌流後の *c-fos* と *c-jun* 過剰発現の時間的推移と蛋白合成比速度ならびにアポトーシス細胞の発現を検討し、以下の知見を得た。

1. 阻血・再灌流後には転写因子 *c-fos* と *c-jun* の mRNA 発現量は増加し、再灌流 15 分後では、それぞれ対照群の 6.3 倍と 4.4 倍であった。
2. 阻血・再灌流群の細胞増殖活性は、再灌流後 5 分から 4 時間までは対照群に比べ有意に増加し、再灌流後 30 分では対照群の 4 倍であった。
3. 阻血・再灌流群の小腸粘膜の蛋白合成比速度はいずれの時間においても対照群に比べて高く、再灌流後 2 時間を最高に徐々に減少し、再灌流後 6 時間の両群間の差は統計学的に有意であった。
4. 阻血・再灌流後には、阻血直後と再灌流後 60 分に 2 峰性を有するアポトーシス発現の亢進を認めた。

以上より、転写因子 *c-fos* と *c-jun* の過剰発現が、小腸の阻血・再灌流後のアポトーシスの発現とその後の蛋白合成の促進に関与していることが明らかにされた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師三輪見一教授に深甚なる謝意を表します。本研究の遂行にあたり、終始直接御指導、御鞭撻を賜りました金沢大学医学部外科学第二講座八木雅夫講師に心から感謝致します。また御助言と御協力を頂きました金沢大学医学部外科学第二講座伏田幸夫助手をはじめ金沢大学医学部外科学第二講座の皆様にも感謝致します。

尚、本研究の要旨は第 97 回日本外科学会総会 (1997, 京都)、第 33 回日本移植学会総会 (1997, 大阪) において発表した。

文 献

- 1) Corner HD. Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat-an electron paramagnetic resonance spin tapping study. *Transplantation* 54: 199-204, 1992
- 2) Ploeg RJ. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation-a multivariate analysis. *Transplantation* 55: 807-813, 1993
- 3) Furukawa H, Todo S, Imventaraza O, Casavilla A, Wu YM, Scotti FC, Broznick B, Bryant J, Day R, Startzl TE. Effect of cold ischemia time on the early outcome of human hepatic allografts preserved with UW solution. *Transplantation* 51: 1000-1004, 1991
- 4) Clavien PA, Harvey R, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. *Transplantation* 53: 957-978, 1992
- 5) Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 4: 3355-3359, 1990
- 6) Kubes P, Ibbotson G, Russel J, Wallace JL, Granger DN. Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9328-9342, 1987
- 7) Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan

JM, Granger DN. Role of neutrophils in ischemia/reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 253: 699-703, 1987

- 8) Horgan MJ, Wright SD, Malik AB. Antibody against leukocyte integrin (CD18) prevents reperfusion-induced lung vascular injury. *Am J Physiol* 259: 315-319, 1990
- 9) Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu Rev Neurosci* 14: 421-451, 1991
- 10) Lau LF, Nathans D. Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with *c-fos* and *c-myc*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1182-1186, 1987
- 11) Ryder K, Lau LF, Nathans D. A gene activated by growth factors is related to the oncogene *v-jun*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1487-1491, 1988
- 12) Rauscher FJ, Cohen DR, Curran T, Bos TJ, Vogt PK, Bohmann D, Tjian R, Franza BR. Fos associated protein p39 is the product of the *jun* proto-oncogene. *Science* 240: 1010-1016, 1988
- 13) Cohen DR, Curran T. *fra -1*: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a Fos-related antigen. *Mol Cell Biol* 8: 2063-2069, 1988
- 14) Goto S, Matsumoto I, Kamada N, Bui A, Saito T, Findlay M, Pujik Z, Wilce P. The induction of immediate early genes in postischemic and transplanted livers in rats. Its relation to organ survival. *Transplantation* 58: 840-844, 1994
- 15) Mark ER, Mark SP. Differential gene expression in the recovery from ischemic renal injury. *Kidney Int* 39: 1156-1161, 1991
- 16) Keith AW, Daryl JD, Nanette HB. Induction and nuclear accumulation of Fos and Jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes. *J Biol Chem* 268: 16852-16858, 1993
- 17) Dragunow M, Young D, Hughes P, MacGibbon G, Lawlor P, Singleton K, Sirimanne E, Beilharz E, Gluckman P. Is *c-jun* involved in nerve cell death following status epilepticus and hypoxic-ischaemic brain injury? *Mol Brain Res* 18: 347-352, 1993
- 18) Smeyne RJ, Vendrell M, Hayward M, Baker SJ, Miao GG, Schilling K, Robertson LM, Curran T, Morgan JI. Continuous *c-fos* expression precedes programmed cell death *in vivo*. *Nature* 363: 166-169, 1993
- 19) Estus S, Zaks WJ, Freeman RS, Gruda M, Bravo R, Johnson EM. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of *c-jun* as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol* 127: 1717-1727, 1994
- 20) Curran T, Franza BR. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* 55: 395-397, 1988
- 21) Franza BR, Rauscher FJ, Josephs SF, Curran T. The fos complex and fos related antigen recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science* 239: 1150-1153, 1988
- 22) Schiaffonati L, Rappocciolo E, Tacchini L, Cairo G, Bernelli-Zazzera A. Reprogramming of gene expression in postischemic rat liver: induction of proto-oncogenes and hsp 70 gene family. *J Cell Physiol* 143: 79-87, 1990
- 23) Colotta F, Polentarutti N, Sironi M, Mantovani A.

Expression and involvement of *c-fos* and *c-jun* protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J Biol Chem* 267: 18278-18283, 1992

24) Steiger E, Vars AE, Dudrick SJ. A technique for long-term intravenous feeding unrestrained rats. *Arch Surg* 104: 330-332, 1972

25) Garlick PJ, Millward DJ, James WP. The diurnal response of muscle and liver protein synthesis in vivo in meal-fed rats. *Biochem J* 136: 935-945, 1973

26) Stein TP, Oram-Smith JC, Leskiw MJ, Wallace HW, Long LC, Leonard JM. Effect of nitrogen and caloric restriction on protein synthesis in the rat. *Am J Physiol* 230: 1321-1325, 1976

27) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992

28) Pujic Z, Matsumoto I, Yamataka A, Miyano T, Wilce P. Induction of immediate-early, ornithine decarboxylase and antizyme gene expression in the rat small intestine after transient ischaemia. *Life Sci* 58: 2289-2296, 1996

29) Marterre WF, Kindy MS, Carney JM, Landrum RW, Strodel WE. Induction of the protooncogene *c-fos* and recovery cytosolic adenosine triphosphate in reperfused liver after transient warm ischemia: effect of nitron free-radical spin-trap agents. *Surgery* 110: 184-191, 1991

30) Howard S, Yulong Z, Lorita D, John EE. Expression of *c-fos* and *c-jun* during hepatocellular remodeling following ischemia/reperfusion in mouse liver. *Hepatology* 23: 1546-1555, 1996

31) Bengmark S, Brojesson B, Olin T. Development of portosystemic shunt after subcutaneous transposition of the spleen: an experimental study in the rat. *Scand J Gastroenterol Suppl* 7: 175-181, 1970

32) Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase- δ auxiliary protein. *Nature* 326: 517-520, 1987

33) Prelich G, Stillman B. Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV40 DNA replication in vitro requires PCNA. *Cell* 53: 117-126, 1988

34) Jaskulski D, DeRiel JK, Mercer WE, Calabretta B, Baserga R. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligonucleotides to PCNA cyclin. *Science* 240: 1545-1546, 1988

35) Nichols AF, Sancar A. Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein. *Nucleic Acids Res* 20: 2441-2446, 1992

36) Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van De Velde CJH, Cornelisse CJ, Van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 41: 7-12, 1993

37) Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labeling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* 170: 1-8, 1993

38) Cohen JJ. Overview: mechanism of apoptosis. *Immunol Today* 14: 126-130, 1993

39) Cohen JJ, Duke RC. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 10: 267-293, 1992

40) Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanism and role in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32: 223-254, 1991

41) Picou D, Taylor-Roberts. The measurement of total protein synthesis and catabolism and nitrogen turnover in infants in different nutritional states and receiving different amounts of dietary protein. *Clin Sci* 36: 283-296, 1967

42) Golden MHN, Waterlow JC. Total protein synthesis in elderly people. A comparison of results with [15 N] glycine and [14 C] leucine. *Clin Sci Mol Med* 53: 277-288, 1977

Overexpression of immediate early gene, *c-fos* and *c-jun* in the rat small intestine after ischemia/reperfusion

Hiroshi Itoh, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. Jusen Med Soc., 106, 644 — 653 (1997)

Key words apoptosis, *c-fos*, *c-jun*, ischemia-reperfusion injury

Abstract

The sequential expression of *c-fos* and *c-jun* was compared with the patterns of three coexistent parameters in order to investigate the mechanism of degeneration and regeneration of small intestine villi following ischemia/reperfusion (I/R). The three parameters were 1) regeneration determined by immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), 2) tissue protein synthesis rates determined by means of [15 N] glycine, 3) programmed cell death determined with the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) method. The expression of *c-fos* and *c-jun* mRNA increased markedly 15 min after reperfusion, and was respectively 6.3 and 4.4 times higher than in controls. PCNA expression was significantly elevated between 5 min and 4 hours, peaking at 30 min following reperfusion, and an increase in protein synthesis rate was observed 2 hours later. Apoptotic indices showed a peak 60 min after reperfusion. These results suggest that the overexpression of *c-fos* and *c-jun* following I/R in the small intestine correlates with programmed cell death and subsequent cellular regeneration.